

A1

**DEMANDE
DE BREVET D'INVENTION**

(21)

N° 76 14242

(54) Procédé de production d'une matière à base de protéines en utilisant du méthane comme source de carbone.

(51) Classification internationale (Int. Cl.²). C 12 D 13/06; C 12 B 1/18.

(22) Date de dépôt 12 mai 1976, à 14 h 42 mn.

(33) (32) (31) Priorité revendiquée : *Demande de brevet déposée en Grande-Bretagne le 14 mai 1975, n. 20.317/1975 au nom de la demanderesse.*

(41) Date de la mise à la disposition du public de la demande B.O.P.I. — «Listes» n. 50 du 10-12-1976.

(71) Déposant : Société dite : THE BRITISH PETROLEUM COMPANY LIMITED, résidant en Grande-Bretagne.

(72) Invention de : Philip Albert Myers et Anthony Paul Regnier.

(73) Titulaire : *Idem* (71)

(74) Mandataire : Cabinet Madeuf, Conseils en brevets.

La présente invention concerne un procédé perfectionné de fermentation pour la production d'une matière à base de protéines, procédé dans lequel on utilise du méthane comme source de carbone et dans lequel la formation de mousse est
5 soit supprimée soit réduite. La présente invention est également relative aux micro-organismes et aux mélanges de micro-organismes à utiliser dans ce procédé.

On connaît des procédés pour la production d'une matière à base de protéines utilisant du méthane comme source de carbone. Dans de tels procédés, un micro-organisme utilisant du
10 méthane est cultivé dans un bouillon comprenant un milieu nutritif aqueux en présence de méthane et d'un gaz contenant de l'oxygène. Le bouillon est contenu dans un appareil de fermentation et est soumis à une agitation pendant l'opération. L'agitation peut être réalisée par le gaz ou le mélange de gaz appli-
15 qués au bouillon seul ou en combinaison avec un agitateur tel qu'une turbine.

La présence de mousse dans les procédés de fermentation peut être une caractéristique indésirable. Dans les cas extrêmes, l'accumulation de mousse dans l'appareil de fermentation
20 est si importante que la mousse déborde. Dans tous les cas, la présence de mousse peut réduire l'efficacité de l'agitation et conduire à un manque d'homogénéité dans le bouillon, ce qui peut affecter la croissance et le rendement du processus de
25 culture.

Diverses techniques chimiques et divers dispositifs mécaniques ont été proposés afin de régler la quantité de mousse dans les fermentations. A titre d'exemple, on a ajouté dans le bouillon des agents anti-mousse tels que de l'huile siliconée.
30 Cependant, ces agents peuvent gêner le métabolisme du processus de culture dans une mesure telle que le taux de production des cellules microbiennes soit réduit. En outre, l'agent anti-mousse peut être transporté dans la biomasse produite par le procédé et peut la contaminer. On a proposé plusieurs dispositifs mécaniques pour régler la quantité de mousse mais ils ne sont pas
35 totalement satisfaisants car ils sont coûteux à installer et à utiliser et ils sont sujets à des pannes.

On a trouvé que dans les procédés de production d'une matière à base de protéines dans lesquels le méthane est utilisé

comme source de carbone, la formation de mousse peut être particulièrement gênante. Les substances favorisant l'apparition de mousse sont formées par le micro-organisme utilisant le méthane pendant la culture. Ces substances sont sécrétées dans le bouillon par le micro-organisme vivant et y sont dispersées sous la forme de produits de lyse lorsque le micro-organisme meurt. On a trouvé que la formation de mousse dans les fermentations utilisant du méthane peut être supprimée ou réduite par l'utilisation dans la culture du procédé de mélanges de souches de micro-organismes.

La présente invention crée un procédé de production d'une matière à base de protéines utilisant du méthane comme source de carbone qui consiste à cultiver dans un bouillon comprenant un milieu nutritif aqueux, en présence de méthane et d'un gaz contenant de l'oxygène libre, un micro-organisme utilisant le méthane et au moins un micro-organisme qui peut utiliser les substances favorisant l'apparition de mousse formées par le micro-organisme utilisant le méthane.

L'opération peut être soit discontinuée soit continue. Il est préférable pour des raisons d'économie de travailler en continu sous des conditions constantes.

Tout milieu aqueux qui est connu comme étant approprié pour la culture de micro-organismes utilisant du méthane est approprié pour être utilisé dans le procédé selon la présente invention. La source d'azote est habituellement une forme d'azote combinée, par exemple, des ions nitrate ou ammonium. Cependant l'azote élémentaire tel que l'azote présent dans l'air convient lorsque le micro-organisme est capable d'utiliser cette source d'azote.

Les substances favorisant l'apparition de mousse sont habituellement des produits de lyse du micro-organisme utilisant le méthane. Ces substances sont des protéines, des lipides, des acides nucléiques et des hydrates de carbone.

Le pH du bouillon pendant la culture peut être maintenu à une valeur comprise dans la gamme de 4,5 à 8,0 et notamment dans la gamme de 5,5 à 7,0. On peut ajouter au bouillon selon les besoins, pour maintenir le pH, un acide ou un alcali tel que, par exemple, un hydroxyde d'un métal alcalin ou de l'ammoniac ou de l'hydroxyde d'ammonium. On préfère travailler à un

pH de l'ordre de 6,5 et à une température d'environ 45°C lorsque le micro-organisme utilisant le méthane est une souche de *Methylococcus*. Lorsque soit l'ammoniac, soit l'hydroxyde d'ammonium est utilisé pour régler le pH, les ions ammonium dans le bouillon peuvent également servir en tant que source d'azote. Les ions ammonium peuvent empêcher ou réduire le taux de croissance du micro-organisme utilisant du méthane. En conséquence, la concentration en ammonium dans le bouillon ne doit pas dépasser avantageusement 100 milligrammes par litre et doit être compris, de préférence, dans la gamme de 2 à 50 milligrammes par litre.

La température peut se situer dans la gamme de 30°C à 55°C, cependant le procédé est habituellement réalisé à une température comprise dans la gamme de 35°C à 50°C et, en particulier, dans la gamme de 45°C à 50°C.

Le méthane peut être amené sous la forme de méthane ou d'un gaz contenant du méthane tel que, par exemple, du gaz naturel ou de gisement. Le gaz contenant de l'oxygène libre est normalement de l'air.

Lors d'une opération continue à des taux de production acceptables industriellement utilisant des mélanges méthane/air, la proportion de méthane amenée au bouillon est normalement de 16 volumes par rapport aux 84 volumes d'air. La proportion du méthane vis-à-vis de l'air peut être comprise dans la gamme de 8 à 40 volumes de méthane pour 92 à 60 volumes d'air.

Lors de l'utilisation de mélanges gaz naturel/air, la proportion de gaz naturel amenée au bouillon est normalement de 17 volumes par rapport aux 83 volumes d'air. La proportion du gaz naturel par rapport à l'air peut être de 8,5 à 42 volumes de gaz naturel pour 91,5 à 58 volumes d'air.

L'agitation peut provenir uniquement du méthane ou du gaz contenant du méthane et du gaz contenant de l'oxygène libre amené dans le bouillon. Cependant, un agitateur peut être employé. Lorsqu'on utilise une turbine, des vitesses de rotation typiques peuvent être comprises dans la gamme de 100 à 3000 tours par minute.

Lors de la mise en oeuvre du procédé, le milieu nutritif aqueux contenant les produits nutritifs, nécessités par le micro-organisme utilisant du méthane pour la croissance,

peut être inoculé avec un mélange de micro-organismes comprenant un micro-organisme utilisant le méthane et un ou plusieurs micro-organismes qui peuvent utiliser les substances favorisant l'apparition de mousse, formées par le micro-organisme utilisant

5 le méthane et la culture, est commencée en présence de méthane et d'un gaz contenant de l'oxygène, habituellement de l'air. A titre de variante, le milieu peut être inoculé à une culture pure d'un micro-organisme utilisant du méthane et la culture peut être commencée sous des conditions non aseptiques.

10 Un ou plusieurs micro-organismes qui peut ou qui peuvent utiliser les substances favorisant l'apparition de mousse, formées par le micro-organisme utilisant le méthane, se développent naturellement sous ces conditions à mesure que la croissance du micro-organisme utilisant du méthane se poursuit.

15 Lors d'une opération normale, la proportion quant au nombre de cellules du micro-organisme utilisant du méthane présentes dans le bouillon par rapport au nombre de cellules du micro-organisme ou des micro-organismes qui peut ou qui peuvent utiliser les substances favorisant l'apparition de mousse
20 peut être comprise dans la gamme de 40 à 98% et notamment dans la gamme de 80 à 95%. La proportion des cellules du micro-organisme ou des micro-organismes qui peut ou qui peuvent utiliser les substances favorisant l'apparition de mousse semble augmenter avec des variations dans les conditions de travail qui
25 conduisent à une lyse des cellules du micro-organisme utilisant le méthane.

Tout micro-organisme utilisant du méthane peut être employé dans le procédé selon la présente invention. Le micro-organisme peut être avantageusement un élément du groupe

30 *Methylomonas*, *Methylobacter*, *Methylosinus* ou *Methylococcus* comme décrit par Whittenbury et Collaborateurs dans : " Journal of General Microbiology (1970) Vol, 61 page 213. Un groupe particulièrement préféré est *Methylococcus* (Whittenbury). Une espèce préférée est *Methylococcus capsulatus*. Cette espèce fut
35 décrite tout d'abord par J.W. Foster et R.H. Davis dans "J. Bacteriology 1966, Vol. 91, page 1924" et ensuite par Wittenbury et Collaborateurs dans "J. Gen. Microbiology" 1970, Vol. 61, page 205. Un micro-organisme particulièrement convenable est la souche Foster et Davis de *Methylococcus capsulatus*

qui a été déposée à la collection de cultures "American Type Culture Collection" où elle porte le numéro 19069. Une autre souche particulièrement convenable de *Methylococcus* a été déposée au "National Collection of Industrial Bacteria, Aberdeen, Ecosse" où elle a reçu le numéro NCIB 10856. Le *Methylococcus capsulatus* numéro NCIB 10856 est une nouvelle souche qui a été isolée dans les laboratoires de la demanderesse à partir d'un échantillon de sol. Sauf les exceptions mentionnées ci-après, les caractéristiques physiologiques et morphologiques de la souche numéro NCIB 10856 sont les mêmes que celles de la souche ATCC numéro 19069. La nouvelle souche NCIB 10856 diffère de la souche connue ATCC 19069 en ce qu'elle donne lieu à une productivité supérieure et un meilleur rendement que la souche ATCC 19069 dans une culture continue. Les deux souches forment une matière capsulaire de polysaccharides extra-cellulaires mais la nouvelle souche produit moins de matière capsulaire que la souche connue. La nouvelle souche peut être séparée plus facilement par centrifugation du bouillon qui la contient que la souche ATCC 19069. On suppose que cette caractéristique est due à la plus petite quantité de matière capsulaire produite.

Le micro-organisme qui peut utiliser les substances favorisant l'apparition de mousse peut être un ou plusieurs des éléments du genre *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Agrobacterium*, *Moraxella*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium*; *Bacillus*, *Micrococcus* ou *Pediococcus*. Jusqu'à 40% du nombre total des cellules microbiennes présentes dans le bouillon peuvent être constituées d'une ou plusieurs bactéries utilisant des substances favorisant l'apparition de mousse qui sont choisies à partir du genre *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Agrobacterium*, *Moraxella* ou *Pseudomonas*. Les bactéries utilisant les substances favorisant l'apparition de mousse des genres *Flavobacterium*, *Bacillus*, *Micrococcus* et *Pediococcus* sont le plus souvent présentes selon une proportion représentant jusqu'à 1% du nombre total des cellules. Le micro-organisme utilisant les substances favorisant l'apparition de mousse est avantageusement un élément du genre *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Agrobacterium*, *Moraxella* ou *Pseudomonas*.

Des exemples de ces micro-organismes qui ont été

isolés dans les laboratoires de la demanderesse et déposés au "National Collection of Industrial Bacteria (NCIB) Aberdeen, Ecosse " sont une souche de Moraxella NCIB numéro 11135, une souche d'Alcaligenes, d'Agrobacterium ou de Pseudomonas NCIB numéro 11136, une souche d'Alcaligenes, d'Agrobacterium ou de Pseudomonas NCIB numéro 11137, une souche d'Alcaligenes ou de Pseudomonas NCIB numéro 11138, une souche d'Alcaligenes NCIB numéro 11139, une souche d'Acinetobacter NCIB numéro 11140, une souche d'Alcaligenes, d'Agrobacterium ou de Pseudomonas NCIB numéro 11141 et une bactérie en forme de bâtonnets variables à coloration Gram non identifiée NCIB numéro 11134. Ces souches sont identifiées en utilisant des essais bactériologiques habituels selon les ouvrages : Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8ème Edition; Skerman, " The Genera of Bacteria, 2ème Edition, Williams et Wilkins CO., Baltimore "; "Identification of Medical Bacteria ", Cowan et Steel, Cambridge University Press, 1966 et " The Distribution and Identification of Non-Fermenting Bacteria" J.J.J. Snell, Public Health Laboratory Service Monograph, Series number 4, H.M.S.O., Londres. Les micro-organismes utilisant les substances favorisant l'apparition de mousse peuvent être employés seuls ou en combinaison.

L'invention est représentée et décrite en détail dans les exemples non limitatifs ci-après.

EXEMPLE 1

On cultive, dans cinq litres (volume de travail) d'un bouillon qui est contenu dans un appareil de fermentation d'une capacité de sept litres, un mélange de bactéries se composant d'une souche de bactérie Methylococcus capsulatus ATCC 19069 utilisant du méthane et de l'azote élémentaire et de bactéries qui peuvent utiliser les substances favorisant l'apparition de mousse, formées par Methylococcus. L'opération est continue et non aseptique. Le bouillon est maintenu à une température de 45°C. L'agitation est obtenue par une turbine tournant à une vitesse de 1000 tours par minute. On ajoute un milieu nutritif aqueux frais au bouillon selon un taux de dilution de 0,18h⁻¹. Le milieu présente la composition suivante:

KH ₂ PO ₄	175,0 milligrammes
Na ₂ HPO ₄ , 12H ₂ O	150,0 "

	MgSO ₄ , 7H ₂ O	85,0 milligrammes
	CaCl ₂ (anhydre)	20,0 "
	CuSO ₄ , 5H ₂ O	2,0 "
5	FeSO ₄ , 7H ₂ O	7,5 "
	ZnSO ₄ , 7H ₂ O	0,5 "
	MnSO ₄ , H ₂ O	0,5 "
	CoCl ₂ , 6H ₂ O	0,02 "
	Na ₂ MoO ₄ , 2H ₂ O	0,2 "
10	Eau distillée	quantité suffisante pour un litre.

Le pH est ajusté à 6,4 en utilisant une solution aqueuse d'hydroxyde de sodium 2,0 N. L'azote est amené sous la forme d'hydroxyde d'ammonium et d'air. La quantité d'hydroxyde d'ammonium amenée au bouillon est suffisante pour satisfaire à 95% du besoin en azote des bactéries présentes. Les 5% restants sont satisfaits par l'azote élémentaire présent dans l'air.

Le méthane est amené à un débit de 6 volumes par volume par heure et l'air à un débit de 24 volumes par volume par heure. La fermentation est stable et donne, sous une opération à conditions constantes, une densité cellulaire de 3,4 grammes par litre et une productivité d'environ 0,61 gramme par litre par heure. Dans tous les exemples, le poids des cellules est exprimé en tant que le poids sec. On n'observe pas de formation de mousse par les bactéries.

On double la concentration du milieu nutritif aqueux et de l'hydroxyde d'ammonium amené au bouillon. Il en résulte une augmentation de la densité cellulaire selon une valeur de 6,5 grammes par litre et une productivité de 1,17 grammes par litre par heure. On n'observe pas la formation de mousse par les bactéries.

La population bactérienne présente dans le bouillon se compose d'environ 85% quant au nombre des cellules de la souche de bactérie *Methylococcus capsulatus* ATCC 19069 utilisant le méthane et l'azote élémentaire et d'environ 15% quant au nombre de cellules d'un mélange de bactéries n'utilisant pas le méthane.

Les bactéries n'utilisant pas le méthane sont isolées en diluant un échantillon du bouillon selon un facteur de 10^8 , en étalant l'échantillon dilué sur de la gélose " Plate Count Agar" (Difco Laboratories) et en laissant incubé pendant

5 quarante-huit heures à 45°C sous des conditions aérobies en l'absence de méthane. Des colonies seules sont enlevées de la gélose et cultivées de manière répétée sur un milieu frais jusqu'à l'obtention d'une culture pure. Les cultures de bactéries isolées de cette façon ont été déposées au "National Collection

10 of Industrial Bacteria, Aberdeen, Ecosse " où elles ont reçu les numéros suivants : 11135, 11136, 11137, 11138, 11139, 11140 et 11141. Les bactéries sont ensuite identifiées selon les ouvrages: "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8ème Edition", Skerman " The Genera of Bacteria 2ème Edition "

15 Williams et Wilkins Co, Baltimore"; Cowan et Steel "Identification of Medical Bacteria ", Cambridge University Press 1966 et " the Distribution and Identification of Non-Fermenting Bacteria", J.J.J. Snell, Public Health Laboratory Service Monograph series number 4, H.M.S.O, Londres. Les résultats

20 obtenus à partir de ces essais sont indiqués au tableau 1 ci-après. Le mélange des bactéries n'utilisant pas le méthane consiste en 3% quant au nombre de cellules d'une souche de bactérie NCIB 11134 en forme de bâtonnets variables à coloration Gram non identifiée et en 12% quant au nombre d'un mélange

25 constitué d'une souche Moraxella NCIB numéro 11135, d'une souche d'Alcaligenes, de Pseudomonas ou d'Agrobacterium NCIB numéro 11136, d'une souche de Pseudomonas ou d'Alcaligenes NCIB numéro 11138, d'une souche d'Alcaligenes NCIB numéro 11139, d'une souche d'Acinetobacter NCIB numéro 11140, d'une souche de

30 Pseudomonas, d'Alcaligenes ou d'Agrobacterium NCIB numéro 11141.

A titre de comparaison, on effectue un essai pour réaliser une fermentation sous des conditions identiques à celles décrites plus haut sauf que la culture est mise en oeuvre sous

35 des conditions aseptiques et le seul micro-organisme présent est la souche de bactérie Methylococcus capsulatus ATCC numéro 19069 utilisant du méthane et de l'azote élémentaire. On réalise une opération continue selon un taux de dilution de $0,18\text{h}^{-1}$ avec une densité cellulaire d'environ 3,3 grammes par litre et une

productivité d'environ 0,59 gramme par litre par heure. La fermentation n'est pas stable en raison de la quantité de mousse formée par la culture. La présence de cette mousse provoque des difficultés pour contrôler les paramètres dans
5 l'appareil de fermentation et on ne peut donc pas obtenir le taux de dilution envisagé ainsi qu'une opération sous des conditions constantes. La mousse réduit également l'efficacité du pompage selon une mesure telle qu'on ne peut pas maintenir un travail constant.

10 On double la concentration du milieu nutritif amené au bouillon. Il en résulte une augmentation dans la densité cellulaire selon une valeur de 5,5 grammes par litre. Cette augmentation de la densité cellulaire est suivie par une formation de mousse incontrôlable ayant pour conséquence la fin
15 de la fermentation. Ceci démontre que la présence d'un mélange de micro-organisme réduit suffisamment la formation de mousse pour une opération continue satisfaisante.

TABEAU 1

Caractéristiques

11134

11135

1. Aspect microscopique

Bâtonnets 0,35-0,5 μ x 1 -1,25 μ Bâtonnets 0,35-0,5 μ x 1,25 -1,5 μ , côtés parallèles, certains sont légèrement incurvés, seuls, quelques chaînes peuvent comporter jusqu'à huit cellules.

2. Morphologie des colonies-GYLA

Rondes, uniformes, brillantes, Diamètre 2 - 3 mm, protubérances, marge entière, beige avec centre convexe, marge entière, jaunâtre.

-NA

Comme GYLA mais translucides avec une couleur gris opaque.

Comme GYLA mais d'un diamètre de 1 mm.

3. Coloration Gram - Méthode A - Méthode B

V

-

4. O/F glucose

F

NR

5. Motilité

+

-

6. Arginine

-

-

7. Sel d'ammonium-Sucres-Maltose

-

-

-Ethanol

-

-

TABLEAU 1 (suite)

9. Tween 80 hydrolyse	+	-
10. Gélatine liquéfaction	-	-
11. ONPG	-	-
12. Oxydase - Plaque	+	+
- Papier filtre	+	+
13. Croissance sur de la gélose Mac Conkey	-	-
14. Malonate	W	+
15. Croissance dans du cyanure de potassium	-	-
16. Uréase	+	-
17. Caséinase	-	-
18. Catalase	-	-
19. Hydrogène sulfuré	-	-
20. Indole	-	-
21. Acétyl-méthyl-carbinol	-	-
22. Réduction en nitrates	+	+
23. Sensibilité à 2,5 u i dans la pénicilline	-	-
24. Croissance anaérobie GYLA	W	-
Croissance anaérobie MJE gélose + 0,2 % glucose	-	-
25. Croissance sur MJE gélose dans 50% méthane	-	-

TABLEAU 1 (suite)

26. Croissance sur MJE dans de la vapeur de butanol	i	-
27. Croissance sur MJE dans de la vapeur d'acétone	-	-
28. Croissance sur MJE dans de la vapeur de méthanol	-	-
29. Croissance sur MJE dans de la vapeur d'éthanol	-	-
30. Croissance sur MJE dans de la vapeur d'éthane	-	-
31. Croissance sur MJE dans de la vapeur de formaldéhyde	-	-
32. Croissance sur MJE dans de la vapeur d'acide formique	-	-
33. Croissance sur MJE dans gélose + 0,2% glucose(poids/volume)	-	+
34. Croissance dans MJE liquide sans rajout	-	-
35. Croissance dans MJE liquide + 0,2% glucose	w	-
36. Croissance dans MJE liquide + 0,2% arabinose	w	-
37. Croissance dans MJE liquide + 0,2% galactose	-	-

TABLEAU 1 (suite)

38. Croissance dans MJE liquide + 0,2% lactose	w	-	
39. Croissance dans MJE liquide + 0,2% xylose	-	-	
40. Croissance dans MJE liquide + 0,2% sucrose	-	-	
41. Croissance dans MJE liquide + 0,2% mannitol	-	-	
42. Croissance dans MJE liquide + 0,2% glycérol	+	-	
43. Croissance dans MJE liquide + 0,2% salicine	-	-	
44. Croissance dans MJE liquide + 0,2% lévulose	-	i	
45. Présence de flagelles (par microscopie électronique)	1 latéral	NT	
46. Sporulation sur milieux contenant du manganèse	-	-	
<hr/>			
1. Aspect microscopique	11136	11137	
	Bâtonnets 0,35-0,5 μ x 1,25 μ , extrémités arrondies, seuls ou en paires.	Bâtonnets 0,5 μ x 1-1,5 μ , extrémités arrondies, côtés parallèles.	
2. Morphologie des colonies - GYLA	rondes, uniformes, étincelantes, diamètre	rondes, devenant mal définies, étatement, étincelantes	

TABLEAU 1 (suite)

	1-2 mm (occasionnellement 2-3mm), faiblement convexes, marge entière, beige.	mucilagineuses, faiblement convexes, beige.
-NA	rondes, uniformes, brillantes, se réunissant facilement, 1 mm, gris translucide.	rondes, uniformes, brillantes, faiblement convexes, 1mm, grisâtre.
3. Coloration Gram - méthode A	coloration irrégulière	Coloration v plus sombre aux bipôles
- méthode B		v
4. O/F glucose	Alk	Alk
5. Motilité	(+)	+
6. Arginine	-	-
7. Sel d'ammonium - Sucres-Maltose	-	-
8. Ethanol	-	-
9. Tween 80 hydrolyse	-	-
10. Gélatine liquéfaction	-	-
11. ONPG	-	-
12. Oxydase-plaque	+	+
-papier filtre	-	+

TABLEAU 1 (suite)

13. Croissance sur de la gélose Mac Conkey	-	-
14. Malonate	+	+
15. Croissance dans du cyanure de potassium	-	-
16. Uréase	+	+
17. Caséinase	-	-
18. Catalase	+	+
19. Hydrogène sulfuré	-	-
20. Indole	-	-
21. Acétyl-Méthyl-carbinol	-	-
22. Réduction en nitrates	-	-
23. Sensibilité à 2,5 u i dans la pénicilline	-	-
24. Croissance anaérobie GYLA	-	-
MJE gélose + 0,2% glucose	-	-
25. Croissance sur MJE gélose dans 50 % méthane	-	-
26. Croissance sur MJE dans de la vapeur de butanol	-	-
27. Croissance sur MJE dans de la vapeur d'acétone	-	-
28. Croissance sur MJE dans de la vapeur de méthanol	-	-

TABLEAU 1 (suite)

29. Croissance sur MJE dans de la vapeur d'éthanol	-	-	-
30. Croissance sur MJE dans de la vapeur d'éthane	-	-	-
31. Croissance sur MJE dans de la vapeur de formaldéhyde	-	-	-
32. Croissance sur MJE dans de la vapeur d'acide formique	-	-	-
33. Croissance sur MJE dans gélose + 0,2% glucose (poids/volume)	+	+	+
34. Croissance dans MJE liquide sans rajout	-	-	i
35. Croissance dans MJE liquide + 0,2% glucose	+	+	+
36. Croissance dans MJE liquide + 0,2% arabinose	+	+	+
37. Croissance dans MJE liquide + 0,2% galactose	+	+	+
38. Croissance dans MJE liquide + 0,2% lactose	+	+	+
39. Croissance dans MJE liquide + 0,2% xylose	-	-	+
40. Croissance dans MJE liquide + 0,2% sucrose	i	i	w
41. Croissance dans MJE liquide + 0,2% mannitol	-	-	w
42. Croissance dans MJE liquide + 0,2% glycérol	+	+	+
43. Croissance dans MJE liquide + 0,2% salicine	+	+	w
44. Croissance dans MJE liquide + 0,2% lévulose	+	+	+
45. Présence de flagelles (par microscopie électronique)	1 ou 2 latérales	péritrichotomes	-
46. Sporulation sur milieux à base de manganèse	-	-	-

TABLEAU 1 (suite)

	11138	11139
1. Aspect microscopique	Bâtonnets 0,5 µx1,5-2 µ, seuls ou en paires, certains en chaînes courtes.	Bâtonnets pléomorphiques, extrémités arrondies, côtés parallèles, apparaissant seuls.
2. Morphologie des colonies -GYLA	Rondes, uniformes, étincelantes, pointe aiguille, faiblement convexes, marge entière, beige opaque	Rondes, uniformes, étincelantes, faiblement convexes, 2-3mm, se réunissent facilement, entières, crème.
-NA	Comme GYLA mais blanc/gris	comme GYLA mais se réunissent moins, plus ou moins translucides, grisâtre avec centre enfoncé.
3. Coloration Gram-méthode A méthode B	+ -	- Coloration irrégulière v
4. O/F Glucose	Alk	Alk
5. Motilité	+	+
6. Arginine	-	-
7. Sel d'ammonium-Sucres-Maltose	-	-
8. Ethanol	+	-
9. Tween 80 hydrolyse	-	+

TABLEAU 1 (suite)

10. Gélatine liquéfaction	-
11. ONPG	-
12. Oxydase-plaque	+
-papier filtre	+
13. Croissance sur de la gélose Mac Conkey	-
14. Malonate	+
15. Croissance dans du cyanure de potassium	-
16. Uréase	-
17. Caséinase	-
18. Catalase	+
19. Hydrogène sulfuré	-
20. Indole	-
21. Acétyl-méthyl-carbinol	-
22. Réduction en nitrates	+
23. Sensibilité à 2,5 u i dans la pénicilline	-
24. Croissance anaérobie GYLA	-
Croissance anaérobie MJE gélose + 0,2% glucose	-
25. Croissance sur MJE gélose dans 50% méthane	-
26. Croissance sur MJE dans de la vapeur de butanol	-
27. Croissance sur MJE dans de la vapeur d'acétone	-
28. Croissance sur MJE dans de la vapeur de méthanol	-
29. Croissance sur MJE dans de la vapeur d'éthanol	-
30. Croissance sur MJE dans de la vapeur d'éthane	-
31. Croissance sur MJE dans de la vapeur de formaldéhyde	-
32. Croissance sur MJE dans de la vapeur d'acide formique	-

TABIEAU 1 (suite)

33. Croissance sur MJE dans gélose + 0,2% glucose (poids/volume)	-	i
34. Croissance dans MJE liquide, sans rajout	-	-
35. Croissance dans MJE liquide + 0,2% glucose	-	i
36. Croissance dans MJE liquide + 0,2% arabinose	+	w
37. Croissance dans MJE liquide + 0,2% galactose	w	i
38. Croissance dans MJE liquide + 0,2% lactose	-	-
39. Croissance dans MJE liquide + 0,2% xylose	-	-
40. Croissance dans MJE liquide + 0,2% sucrose	-	-
41. Croissance dans MJE liquide + 0,2% mannitol	-	-
42. Croissance dans MJE liquide + 0,2% glycérol	-	+
43. Croissance dans MJE liquide + 0,2% salicine	-	-
44. Croissance dans MJE liquide + 0,2% lévulose	-	+
45. Présence de flagelles (par microscopie électronique)	1 polaire	NT
46. Sporulation sur milieux à base de manganèse	-	-

1. Aspect microscopique	11140	11141
2. Morphologie des colonies-GYLA	Bâtonnets pléomorphiques, côtés parallèles arrondis	Bâtonnets 0,35 μ x 1,75 μ , côtés non parallèles. Mal définies, fai- blement convexes, étincelantes, mucoïdes, beige.
	rondes, uniformes, bril- lantes, faiblement conve- xes, marge plus ou moins entière, 2mm, centre translucide, crème opaque.	

TABIEAU 1 (suite)

-NA	Comme GYLA mais centre translucide, marge occasionnellement irrégulière.	mucoïdes se réunissant, étincelants, grisâtres. Colonie occasionnellement en aiguille.
3. Coloration Gram - méthode A - méthode B	Coloration irrégulière v Coloration irrégulière v	v coloration irrégulière v
4. O/F glucose	Alk	Alk
5. Motilité	(+)	+
6. Arginine	-	-
7. Sel d'ammonium -Sucres-Maltose	-	-
8. -Ethanol	-	-
9. Tween 80 hydrolyse	+	-
10. Gélatine liquéfaction	-	-
11. ONPG	-	-
12. Oxydase - plaque - papier filtre	- -	+ -
13. Croissance sur de la gélose Mac Conkey	+	-
14. Malonate	+	+
15. Croissance dans du cyanure de potassium	-	-
16. Uréase	-	+
17. Caséinase	-	-

TABLEAU 1 (suite)

18. Catalase	+	+
19. Hydrogène sulfuré	-	-
20. Indole	-	-
21. Acétyl/méthyl-carbinol	-	-
22. Réduction en nitrates	-	-
23. Sensibilité à 2,5 u i dans la pénicilline	-	-
24. Croissance anaérobie GYLA	-	-
MJE gélose + 0,2% glucose		
25. Croissance sur MJE gélose dans 50% méthane	-	-
26. Croissance sur MJE dans de la vapeur de butanol	-	-
27. Croissance sur MJE dans de la vapeur d'acétone	-	-
28. Croissance sur MJE dans de la vapeur de méthanol	-	-
29. Croissance sur MJE dans de la vapeur d'éthanol	-	-
30. Croissance sur MJE dans de la vapeur d'éthane	-	-
31. Croissance sur MJE dans de la vapeur de formaldéhyde	-	-
32. Croissance sur MJE dans de la vapeur d'acide formique	-	-
33. Croissance dans MJE gélose + 0,2% glucose (poids/volume)	-	-
34. Croissance dans MJE liquide sans rajout	-	-
35. Croissance dans MJE liquide + 0,2% glucose	i	i
36. Croissance dans MJE liquide + 0,2% arabinose	w	w
37. Croissance dans MJE liquide + 0,2% galactose	-	-
38. Croissance dans MJE liquide + 0,2% lactose	-	-
39. Croissance dans MJE liquide + 0,2% xylose	-	-

TABLEAU 1 (suite)

40. Croissance dans MJE liquide + 0,2% sucrose	-	-	-
41. Croissance dans MJE liquide + 0,2% mannitol	+	W	-
42. Croissance dans MJE liquide + 0,2% glycérol	+	-	-
43. Croissance dans MJE liquide + 0,2% salicine	-	-	-
44. Croissance dans MJE liquide + 0,2% lévulose	W	-	-
45. Présence de flagelles (par microscopie électronique)	NT	2 ou plusieus latérales.	
46. Sporulation sur milieux contenant du manganèse	-	-	-

Explications des abréviations utilisées dans le tableau 1
ci-dessus.

	+	réaction positive	
	-	réaction négative	
5	v	variable	
	w	faible	
	i	non concluant	
	F	réaction de fermentation dans le milieu	
	NR	pas de réaction	
10	Alk	essai aérobic en tube à réaction alcaline	
	(+)	certaines des cellules observées mais non la majorité sont mobiles (motilité)	
	(NT)	non éprouvé	
	O/F	oxydation/fermentation	
15	GYLA	glucose-levure-lemco-gélose	
		glucose	5 g
		peptone	10 g
		extrait de levure (Difco)	5 g
		lab lemco	10 g
20		gélose	20 g
		eau distillée	1000 ml
		autoclave à 121°C pendant quinze minutes	
	NA	gélose nutritive (oxoïde CM3)	
	MJE	milieu minéral (solide et liquide)	
25		<u>Composition</u>	
	Solution A	Phosphate di-acide de potassium KH_2PO_4	16 g
		Phosphate acide disodique $\text{Na}_2\text{HPO}_4, 12\text{H}_2\text{O}$	11,6 g
30		Eau distillée	100 ml
	Solution B	Nitrate de sodium NaNO_3	11,8 g
		Eau distillée	100 ml
	Solution C	Sulfate ferreux $\text{FeSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$	1,4 g
		Eau distillée	100 ml
35	Solution D	Sulfate de magnésium $\text{MgSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$	8 g
		Nitrate de calcium $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2, 4\text{H}_2\text{O}$	2,5 g
		Sulfate de cuivre $\text{CuSO}_4, 5\text{H}_2\text{O}$	0,4 g
		Sulfate de zinc $\text{ZnSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$	0,034 g
		Sulfate de manganèse $\text{MnSO}_4, \text{H}_2\text{O}$	0,030 g

Molybdate de sodium $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,024 g
Eau distillée 600 ml

Solution E Les solutions A à D sont stérilisées par une filtration sur membrane et sont conservées en tant que quatre solutions de réserve stériles concentrées.

Le milieu liquide MJE est obtenu en mélangeant 10 ml de solution A, 10 ml de solution B, 1 ml de solution C et 1,5 ml de solution D, en ajoutant de l'eau d'appoint pour obtenir un volume de 1 litre et en traitant ce milieu à l'autoclave à 121°C pendant quinze minutes. Le milieu solide MJE est obtenu en ajoutant 10g de gélose "Difco Noble agar" au milieu liquide MJE préparé comme décrit plus haut avant son traitement à l'autoclave.

Coloration Gram

(a) La méthode A est décrite dans "Laboratory Methods in Microbiology" Harrigan, W.F. et Mc Cance, M.E. Academic Press, (1966).

(b) La méthode B est telle que celle décrite dans "Methods for the morphological examination et aerobic Coryneform bacteria. Sampling-microbiological monitoring of environments". Curr, G.L. et Keddie, R.M. Societe for Applied Bacteriology Technical series N-7, Academic Press (1973).

Motilité.

Les cultures sont examinées pour la motilité après une croissance pendant dix-huit heures à 30°C sur des fragments NA. La base de chaque fragment est immergée dans de l'eau distillée stérile. La partie qui croît après incubation est prélevée de l'interface air-eau et est examinée par microscopie à contact de phase.

Milieu à base de manganèse pour la sporulation - parties NA auxquelles on a ajouté 2 μg d'ions Mn^{++} par ml (sous la forme de sulfate de manganèse). Les cultures reçoivent une incubation pendant une durée pouvant représenter jusqu'à quatorze jours à 30°C et sont ensuite colorées pour les spores. Les cultures sont ensuite éprouvées pour la viabilité après une exposition à 80°C pendant dix minutes.

Le processus pour les autres essais est décrit dans Cowan, S.T. et Steel, K.J. "Manual for the identification of medical

bacteria", Cambridge University Presse (1966)

EXEMPLE 2

On ajoute 4500 ml d'un milieu nutritif aqueux stérile dans un appareil de fermentation stérile d'une capacité de sept
5 litres. Le milieu nutritif aqueux présente la composition décrite plus haut à l'exemple 1 sauf qu'il contient 1.770 mg par litre d'acide nitrique. L'appareil de fermentation reçoit l'inoculation de 500 ml d'une culture pure se développant
10 d'une manière active d'une souche de micro-organismes *Methylococcus capsulatus* ATCC numéro 19069 utilisant du méthane et de l'azote élémentaire et est ensuite mis en fonctionnement de façon aseptique sous des conditions discontinues avec une vitesse d'agitation de 500 tours par minute, un taux d'aération de dix volumes par volume par heure et un débit de circulation du
15 méthane de dix volumes par volume par heure. Le pH du bouillon est maintenu à 6,5 par l'addition d'une solution d'hydroxyde de sodium 1,0 N ou d'une solution d'acide sulfurique 3,6 N selon les besoins. Lorsque la densité des cellules atteint 1,0 g par litre, la vitesse d'agitation est augmentée à 1000 tours par
20 minute. On réalise alors une opération continue à un taux de dilution de $0,05 \text{ h}^{-1}$. Le taux de dilution est augmenté à $0,1 \text{ h}^{-1}$ après douze heures d'opération en continu et, après douze heures supplémentaires, le taux d'aération est accru à vingt-quatre volumes par volume par heure et le débit d'alimentation de
25 méthane à six volumes par volume par heure. Après quinze heures supplémentaires, le taux de dilution est augmenté à $0,18 \text{ h}^{-1}$. La densité des cellules est de 3,3 g par litre et le taux de production est environ de 0,59 g par litre par heure. L'opération est instable en raison de la présence de la mousse formée
30 par la culture. Cette mousse empêche une opération sous des conditions constantes. A ce stade, on abandonne les conditions aseptiques et, après deux heures d'opération sous des conditions non aseptiques, la mousse commence à diminuer et plusieurs souches différentes de bactéries apparaissent dans le bouillon.
35 Après vingt-quatre heures supplémentaires, une opération sous des conditions constantes est possible avec une densité des cellules de 3,4 grammes par litre et un taux de production d'environ 0,61 gramme par litre par heure. On ne constate pas la formation de mousse. Une analyse du bouillon donne une

population bactérienne qui est identique à celle de l'exemple 1. Cet exemple démontre que la formation de la mousse peut être réduite efficacement par la présence d'un mélange de micro-organismes.

EXEMPLE 3

On ajoute dans la cuve d'un appareil de fermentation, d'une capacité de sept litres, 4,5 litres d'un milieu nutritif aqueux présentant la composition suivante :

	HNO_3	3500,0 mg
10	KH_2PO_4	350,0 mg
	$\text{Na}_2\text{HPO}_4, 12\text{H}_2\text{O}$	300,0 mg
	$\text{MgSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$	170,0 mg
	$\text{CaCl}_2(\text{anhydre})$	40,0 mg
15	$\text{CuSO}_4, 5\text{H}_2\text{O}$	4,0 mg
	$\text{FeSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$	15,0 mg
	$\text{ZnSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$	1,0 mg
	$\text{MnSO}_4, \text{H}_2\text{O}$	1,0 mg
	$\text{CoCl}_2, 6\text{H}_2\text{O}$	0,04 mg
20	$\text{Na}_2\text{MoO}_4, 2\text{H}_2\text{O}$	0,4 mg
	Eau distillée	quantité suffisante pour un litre.

Le pH du milieu est ajusté à 6,4 par l'addition d'hydroxyde de sodium aqueux 2,0 N. L'appareil de fermentation reçoit alors l'inoculation de 500 ml d'une culture à croissance aseptique d'une fiole sous agitation d'une souche *Methylococcus capsulatus* ATCC n° 19069 et l'opération est commencée sous des conditions de développement discontinu à une vitesse d'agitation de 1000 tours par minute, une température de 45°C, un débit d'admission d'air de 10 volumes par volume par heure et un débit d'admission de méthane de 10 volumes par volume par heure.

Le pH est réglé à 6,4 par l'addition d'une solution aqueuse d'hydroxyde de sodium 2,0 N ou d'une solution d'acide sulfurique 3,6 N en utilisant un dispositif de dosage automatique. Lorsque la densité des cellules atteint 2,0 grammes par

litre, une opération continue est réalisée en amenant le milieu nutritif aqueux, de façon continue, dans le bouillon et en retirant le bouillon selon un taux qui maintient un volume de travail constant de cinq litres dans l'appareil de fermentation. Le taux de dilution initial est de $0,05h^{-1}$. A mesure que la densité des cellules augmente, le taux de dilution, la vitesse d'agitation, le débit d'introduction du méthane et le débit d'introduction de l'air sont progressivement augmentés pour obtenir, après trente-six heures d'opération continue, un taux de dilution de $0,18h^{-1}$, une vitesse d'agitation de 2000 tours par minute, un débit d'admission d'air de quarante-huit volumes par volume par heure et un débit d'admission de méthane de douze volumes par volume par heure.

A ce stade, le milieu nutritif aqueux est changé en celui qui ne contient pas d'acide nitrique. Le nouveau milieu présente la composition suivante :

	KH_2PO_4	700	mg
	$Na_2HPO_4, 12H_2O$	600	mg
20	$MgSO_4, 7H_2O$	340	mg
	$CaCl_2$ (anhydre)	80	mg
	$CuSO_4, 5H_2O$	8	mg
	$FeSO_4, 7H_2O$	30	mg
	$ZnSO_4, 7H_2O$	2	mg
25	$MnSO_4, H_2O$	2	mg
	$CoCl_2, 6H_2O$	0,08	mg
	$Na_2NO_3, 2H_2O$	0,8	mg
	Eau distillée	quantité suffisante pour 1 litre.	

On ajoute séparément au bouillon de l'azote sous la forme d'hydroxyde d'ammonium. Le taux d'addition est suffisant pour qu'il couvre environ 95% de l'azote nécessaire pour la croissance du micro-organisme. Le taux est déterminé en estimant la densité des cellules de la culture se développant (par un procédé optique densimétrique) et en utilisant la densité des cellules pour mesurer le taux selon lequel l'azote a été

incorporé dans la biomasse. Les 5% restants (approximativement) de l'azote nécessaire pour la croissance sont satisfaits par l'azote élémentaire présent dans l'air amené au bouillon.

Après soixante heures supplémentaires, on obtient par
5 une opération continue, sous des conditions constantes, une densité des cellules de 11,67 g de poids sec par litre et un débit de production de 2,1 g par litre par heure. On ne constate pas la formation de mousse par la culture. L'analyse des bac-
téries présentes dans le bouillon donne la même population
10 que celle décrite à l'exemple 1.

EXEMPLE 4

On répète le procédé décrit à l'exemple 3 sauf que la souche de micro-organisme utilisant du méthane *Methylococcus capsulatus* ATCC numéro 19069 est remplacée par une nouvelle
15 souche de *Methylococcus capsulatus* NCIB numéro 10856. La nouvelle souche est isolée d'un échantillon de sol. On obtient avec une opération continue, sous des conditions constantes, une densité des cellules de 13,14g de poids sec par litre par
heure, ce qui correspond à un débit de production de 2,4 grammes
20 par litre par heure. Il n'y a pas de production de mousse et l'analyse de la population bactérienne présente dans le bouillon indique qu'elle est identique à celle décrite à l'exemple 1
sauf que le micro-organisme utilisant le méthane est la souche
Methylococcus capsulatus NCIB numéro 10856.

25 Le bouillon cultivé à partir de l'appareil de fermentation lorsqu'il a reçu un traitement sous des conditions constantes est introduit dans une centrifugeuse à circulation continue Sharples Type 16 fonctionnant à 17.000 tours par minute. La centrifugation est réalisée selon deux débits différents d'alimentation, à savoir 571 ml par minute et 774 ml par minute. La
30 concentration de la biomasse dans le bouillon introduit dans la centrifugeuse et la concentration de la biomasse dans l'effluent aqueux déchargé de la centrifugeuse sont mesurées conformément au poids des cellules sèches par litre. Le poids de la biomasse
35 récupérée de la centrifugeuse est ensuite estimé à partir des mesures du poids des cellules sèches. Les résultats ainsi obtenus sont indiqués au tableau 2 ci-après.

A titre de comparaison, le bouillon cultivé, conformément au procédé décrit à l'exemple 3, est centrifugé sous des

conditions identiques à celles décrites plus haut et les résultats ainsi obtenus sont indiqués au tableau 2 ci-après.

5 Les résultats montrent que pratiquement toute la biomasse peut être récupérée par centrifugation du bouillon contenant la nouvelle souche *Methylococcus capsulatus* NCIB numéro 10856 tandis que seulement environ 97,5% de la biomasse peuvent être récupérés du bouillon contenant la souche connue *Methylococcus capsulatus* ATCC numéro 19069. Les résultats démontrent également que, sous des conditions de travail identiques, la
10 productivité de la nouvelle souche NCIB numéro 10856 est bien supérieure à celle de la souche connue ATCC numéro 19069.

En plus des caractéristiques décrites plus haut, la nouvelle souche présente un rendement supérieur sur le méthane que la souche connue. La nouvelle souche *Methylococcus capsulatus* NCIB numéro 10856 diffère également de la souche connue en
15 ce qu'elle produit moins de matière à base de polysaccharides capsulaire par poids unitaire de biomasse que la souche connue ATCC numéro 19069. On suppose que les caractéristiques supérieures de centrifugation de la nouvelle souche sont dues à la
20 quantité réduite de matière capsulaire produite par les micro-organismes.

TABLEAU 2

COMPARAISON DES RESULTATS DES CENTRIFUGATIONS OBTENUS AVEC UN BOUILLON CONTENANT LA SOUCHE METHYLOCOCCUS CAPSULATUS ATCC NUMERO 19069 COMME DECRIT A L'EXEMPLE 3 ET UN BOUILLON CONTENANT LA SOUCHE METHYLOCOCCUS CAPSULATUS NCIB NUMERO 10856 TEL QUE DECRIT DANS L'EXEMPLE 4.

	Débit 774 ml/mn			Débit 571 ml/mn		
	M.capsulatus ATCC 19069	M.capsulatus NCIB 10856	M.capsulatus ATCC 19069	M.capsulatus ATCC 19069	M.capsulatus NCIB 10856	M.capsulatus NCIB 10856
Concentration de la biomasse dans le bouillon de culture pénétrant dans la centrifugeuse	11,67	13,14	10,50	12,90		
Concentration de la biomasse dans l'effluent quittant la centrifugeuse	0,29	<0,0015	0,26	0,0015		
* * Récupération de biomasse d'un litre du bouillon de culture	11,38	13,14	10,24	12,90		
* * récupération pourcentage	97,56	100	97,48	100		
Perte pourcentage	2,44	0	2,52	0		

Centrifugeuse : Sharples Type 16
vitesse fixée à 17.000 tours par minute (= 17000g)

REVENDEICATIONS

- 1 - Procédé de production d'une matière à base de protéines en utilisant du méthane comme source de carbone, ledit procédé consistant à cultiver un micro-organisme utilisant du méthane dans un bouillon comprenant un milieu nutritif aqueux, en présence de méthane et d'un gaz contenant de l'oxygène libre, caractérisé en ce que, en plus du micro-organisme utilisant le méthane, au moins un micro-organisme qui peut utiliser les substances favorisant l'apparition de mousse, formées par le micro-organisme utilisant le méthane, est présent dans le bouillon.
- 2 - Procédé suivant la revendication 1, caractérisé en ce que le micro-organisme utilisant le méthane est un élément du groupe *Methylomonas*, *Methylobacter*, *Methylosinus* ou *Methylococcus*.
- 3 - Procédé suivant l'une des revendications 1 et 2, caractérisé en ce que le micro-organisme utilisant le méthane est une souche de *Methylococcus capsulatus*.
- 4 - Procédé suivant l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que le micro-organisme utilisant le méthane est la souche *Methylococcus capsulatus* NCIB numéro 10856.
- 5 - Procédé suivant l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que le micro-organisme utilisant du méthane peut utiliser de l'azote élémentaire en tant que source d'azote.
- 6 - Procédé suivant l'une des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que le micro-organisme qui peut utiliser les substances favorisant l'apparition de mousse est un élément du genre *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Agrobacterium*, *Moraxella*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Bacillus*, *Micrococcus* ou *Pediococcus*.
- 7 - Procédé suivant l'une des revendications 1 à 6, caractérisé en ce qu'un mélange de micro-organismes qui peuvent utiliser les substances favorisant l'apparition de mousse est présent, le mélange comprenant un élément de chacun des genres *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Agrobacterium*, *Moraxella* et *Pseudomonas*.
- 8 - Procédé suivant l'une des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que le micro-organisme qui peut utiliser des substances favorisant l'apparition de mousse est une souche d'une bactérie NCIB numéro 11134.
- 9 - Procédé suivant l'une des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que le micro-organisme qui peut utiliser les

substances favorisant l'apparition de mousse est une souche Moraxella NCIB numéro 11135.

10 - Procédé suivant l'une des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que le micro-organisme qui peut utiliser les substances favorisant l'apparition de mousse est une souche d'Alcaligenes, d'Agrobacterium ou de Pseudomonas NCIB numéro 11136.

11 - Procédé suivant l'une des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que le micro-organisme qui peut utiliser les substances favorisant l'apparition de mousse est une souche d'Alcaligenes, d'Agrobacterium ou de Pseudomonas NCIB numéro 11137.

12 - Procédé suivant l'une des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que le micro-organisme qui peut utiliser les substances favorisant l'apparition de mousse est une souche d'Alcaligenes ou de Pseudomonas NCIB numéro 11138.

13 - Procédé suivant l'une des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que le micro-organisme qui peut utiliser les substances favorisant l'apparition de mousse est une souche d'Alcaligenes NCIB numéro 11139.

14 - Procédé suivant l'une des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que le micro-organisme qui peut utiliser les substances favorisant l'apparition de mousse est une souche d'Acinetobacter NCIB numéro 11140.

15 - Procédé suivant l'une des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que le micro-organisme qui peut utiliser les substances favorisant l'apparition de mousse est une souche d'Alcaligenes, d'Agrobacterium ou de Pseudomonas NCIB numéro 11141.

16 - Procédé suivant l'une des revendications 1 à 15, caractérisé en ce que la proportion quant au nombre de cellules du micro-organisme utilisant du méthane présent dans le bouillon par rapport au nombre de cellules du micro-organisme ou des micro-organismes qui peut ou qui peuvent utiliser les substances favorisant l'apparition de mousse est comprise dans la gamme de 40 à 98 %.

17 - Procédé suivant l'une des revendications 1 à 16, caractérisé en ce que le pH du bouillon est d'une valeur comprise dans la gamme de 5,5 à 7,0.

18 - Procédé suivant l'une des revendications 1 à 17, caractérisé en ce que la température du bouillon est d'une valeur comprise dans la gamme de 30°C à 55°C.

5 19 - Procédé suivant l'une des revendications 1 à 18, caractérisé en ce que la concentration des ions ammonium dans le bouillon est comprise dans la gamme de 2 à 50 milligrammes par litre.

20 - La souche *Methylococcus capsulatus* NCIB numéro 10856.

10 21 - La souche de bactérie NCIB numéro 11134.

22 - La souche de *Moraxella* NCIB numéro 11135.

23 - La souche d'*Alcaligenes*, d'*Agrobacterium* ou de *Pseudomonas* NCIB numéro 11136.

15 24 - La souche d'*Alcaligenes*, d'*Agrobacterium* ou de *Pseudomonas* NCIB numéro 11137.

25 - La souche d'*Alcaligenes* ou de *Pseudomonas* NCIB numéro 11138.

26 - La souche d'*Alcaligenes* NCIB numéro 11139.

27 - La souche d'*Acinetobacter* NCIB numéro 11140

20 28 - La souche d'*Alcaligenes*, d'*Agrobacterium* ou de *Pseudomonas* NCIB numéro 11141.